

CHIMIE BIOLOGIQUE. — *Action de la présure sur la caséine α . Application de la méthode titrimétrique à pH constant* ⁽¹⁾. Note (*) de MM. JEAN GARNIER, GERMAIN MOCQUOT et M^{me} GHISLAINE BRIGNON, présentée par M. Maurice Lemoigne.

Au cours de l'action de la présure cristallisée sur la caséine α , il apparaît pour deux molécules de caséine α un groupe ionisable de pK moyen compris entre 4 et 5. L'hypothèse de la coupure par la présure d'une liaison ester est envisagée.

Nous avons montré précédemment que l'action de la présure sur la caséine entière du lait de vache se traduisait, dans une phase primaire, par la libération, à pH 6,95 de $1,5 \cdot 10^{-6}$ mole H^+ par gramme de caséine ⁽²⁾. Nous avons étudié ici, avec le même dispositif expérimental, l'action de la présure cristallisée sur la caséine α , préparée selon McKenzie et Wake ⁽³⁾.

On sait que l'action de la présure sur des solutions de caséine α à pH neutre entraîne la formation d'un précipité fibrillaire ⁽³⁾ et nous avons observé que cette action s'accompagnait d'une libération relativement importante de produits azotés solubles dans l'acide trichloracétique à 2 et 12 % (représentant respectivement 25 et 10-12 % de l'azote total de la caséine α).

Nous avons étudié la protéolyse en milieu NaCl 0,1 M à pH 6,95 à différentes températures, en maintenant le pH constant à $\pm 0,002$ unité pH par addition de soude N/50 ou N/100 (*fig. 1*). Dans ces conditions nous avons titré $1,8 \pm 0,35 \cdot 10^{-3}$ mole de H^+ par gramme de caséine α en fin de réaction, ceci calculé en prenant comme coefficient d'extinction pour la caséine α , $E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}} = 1,05$ à $2,78 \text{ m}\mu$ en tampon phosphate pH 7. [En fait, une faible protéolyse, appréciable seulement avec de fortes doses de présure (*fig. 1*, courbe 2) se produit encore après le point que nous considérons comme marquant la fin de la réaction.] Nous avons constaté que, dans la zone de pH comprise entre 5,4 et 7,4 le nombre de groupes titrés ne varie pas, compte tenu de la précision de nos mesures (tableau I).

TABLEAU I.

Variations du nombre de protons liérés avec le pH.

pH.	$10^{-5}H^+/g.$	pH.	$10^{-5}H^+/g.$
7,4	1,87	5,9	1,93
6,9	1,85(*)	5,4	1,90
6,4	2,0	3,2	0

(*) Moyenne de 11 déterminations, écart type sur la moyenne : $s' = 0,13 \cdot 10^{-5}H^+/g.$

Parallèlement, nous avons vérifié que la quantité totale de produits azotés solubles dans l'acide trichloracétique à 12 % ne variait pas non plus, observation qui confirme celle de Nitschmann et Bohren ⁽⁴⁾ pour la caséine

entière. Le pK moyen des groupes titrés est donc inférieur à 5 sinon on observerait une variation, plus grande que l'erreur expérimentale, du nombre de groupes titrés en fonction du pH. D'autre part, la caséine α est insoluble entre pH 5,4 et 3,3; aussi n'avons-nous pas mesuré les protons libérés dans cette zone de pH. Cependant, à pH 3,2, nous avons obtenu, avec difficulté, une solution de caséine α à laquelle nous avons ajouté de la présure : aucune libération de protons n'a été observée, bien que la caséine α ait été effectivement transformée en paracaséine α . Ce dernier point a été vérifié, d'abord en observant que la paracaséine α est soluble à pH 3,2 et (contrairement à la caséine α) conserve sa solubilité jusqu'à pH 4,4 environ; ensuite en neutralisant (par addition de soude N/10) jusqu'à pH 7 et en observant alors la formation immédiate du précipité

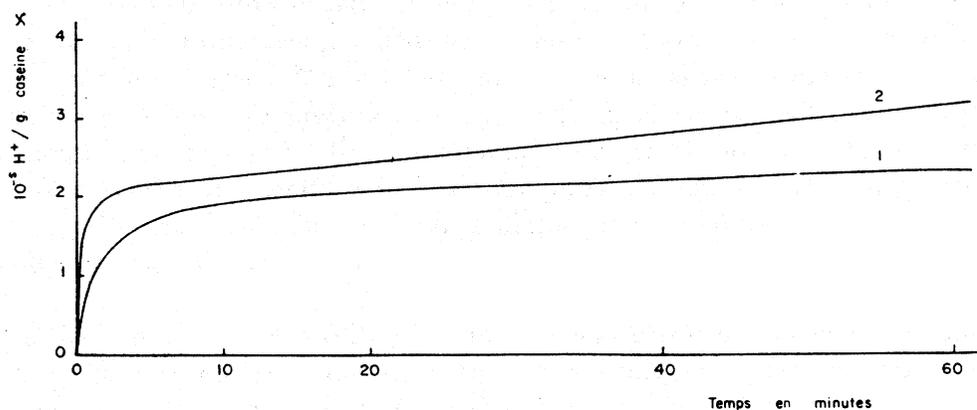


Fig. 1. — Nombre de groupes titrés en fonction du temps au cours de l'action de la présure cristallisée sur la caséine α à pH 6,95 et à 25°C.
 Courbe 1 : $s = 3,7$ mg de caséine α /ml; $e = 0,086$ U. P./ml (1,8 γ de présure/ml).
 Courbe 2 : $s = 5,2$ mg de caséine α /ml; $e = 5,2$ U. P./ml (110 γ de présure/ml).

fibrillaire, caractéristique de la paracaséine α . L'absence de libération de protons à pH 3,2 indique une valeur de pK supérieure ou égale à 4, compte tenu de la précision de nos mesures.

Nous pouvons déduire en groupant tous ces résultats que la valeur du pK moyen des groupes titrés est comprise entre 4 et 5. Une telle valeur ne correspond pas à la dissociation d'un groupe α aminé pour lequel on ne connaît pas de pK inférieur à 6⁽⁵⁾, mais plutôt à la dissociation d'un groupe carboxyle dont le pK est au voisinage de 4 lorsque ce groupe est en position terminale ou sur une chaîne latérale d'une chaîne polypeptidique. On est ainsi conduit à penser que la présure coupe une liaison de type ester dans laquelle le groupe carboxylique est le groupement ionisable. Nous avons trouvé pour la rupture de cette liaison une énergie d'activation du complexe intermédiaire $\Delta H^* = 6\,500 \pm 700$ c/mole, valeur voisine de celle trouvée pour l'hydrolyse d'une liaison ester par les estérases. D'après Jollès, Alais et Jollès⁽⁶⁾ le caséinoglycopeptide, séparé de la caséine α par la présure, a les mêmes acides C terminaux que la caséine α ; il est

donc situé dans la partie C terminale de la caséine α . De plus, ces auteurs n'ont pas trouvé d'acide aminé N terminal; la liaison coupée par la présure peut donc être constituée par le groupement carboxylique C terminal de la paracaséine α et une fonction non ionisée telle qu'une fonction alcool du caséinoglycopeptide (sucre, sérine ou thréonine). Une étude plus complète de la spécificité de la présure et de la structure du caséinoglycopeptide doit permettre de préciser la nature de cette liaison.

Les mesures faites à pH 6,95, très supérieur au pK moyen des groupes titrés, représentent le nombre total de groupes ionisables apparaissant au cours de l'action de la présure. Ce nombre reste faible bien que largement supérieur à celui observé pour la caséine entière. Nous trouvons $1 \pm 0,2$ liaison rompue pour 55 000 g de caséine α , soit approximativement une liaison rompue pour deux monomères, en admettant pour le monomère un poids moléculaire de $26\ 000 \pm 3\ 000$ selon McKenzie et Wake (⁷). A pH neutre, d'après Waugh et al (⁸) (⁹) la caséine α est fortement polymérisée ($S = 13,6$, soit 16 à 37 monomères). Cependant, comme l'activité de la présure est à peu près la même, d'après Alais et coll. (¹⁰), dans des solutions de caséinate de sodium et dans le lait, on peut penser que le degré de polymérisation n'est pas un facteur limitant de la protéolyse, soit que la présure réagisse avec la forme monomère ou dimère en équilibre avec la forme polymère, soit que la polymérisation ne modifie pas le nombre de liaisons accessibles.

D'autre part, nous avons observé que l'addition de caséine α_2 à la caséine α a pour conséquence, non seulement de retarder et même d'empêcher la précipitation fibrillaire de la caséine α par la présure, mais aussi de réduire le nombre de groupes titrables sans modifier pour autant la libération des produits azotés solubles dans l'acide trichloracétique à 2 et 12 %. Aussi nous avons vérifié qu'une addition de 5 % de caséine α_2 , limite supérieure du contenu possible de la caséine α en α_2 , n'entraîne pas une réduction du nombre de groupes titrés compte tenu de la précision de nos mesures.

(*) Séance du 3 janvier 1962.

(¹) Ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des États-Unis (FG-Fr-103-61).

(²) J. GARNIER, *Comptes rendus*, 247, 1958, p. 1515.

(³) H. A. Mc KENZIE et R. G. WAKE, *Biochim. Biophys. Acta*, 47, 1961, p. 240.

(⁴) H. NITSCHMANN et H. U. BOHREN, *Helv. Chim. Acta*, 36, 1955, p. 1953.

(⁵) I. M. KLOTZ, *A Symposium on the mechanism of enzyme action*, John Hopkins Press, 1954.

(⁶) P. JOLLES, C. ALAIS et J. JOLLES, *Biochim. Biophys. Acta*, 51, 1961, p. 309.

(⁷) H. A. Mc KENZIE et R. G. WAKE, *Aust. J. Biol. Sc.*, 12, 1959, p. 712.

(⁸) D. F. WAUGH et J. VON HIPPEL, *Amer. Chem. Soc.*, 78, 1956, p. 4576.

(⁹) D. F. WAUGH, *Farad. Soc. Disc.*, 25, 1958, p. 186.

(¹⁰) C. ALAIS, G. MOCQUOT, H. NITSCHMANN et P. ZAHLER, *Helv. Chim. Acta*, 36, 1953, p. 1955.